

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-319191

(43)Date of publication of application : 21.11.2000

(51)Int.Cl.

A61K 35/78

A61P 15/10

A61P 43/00

(21)Application number : 11-135935

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 17.05.1999

(72)Inventor : OKUNO KENJI
TARUI NAOKI
AKIMOTO KOJI

(30)Priority

Priority number : 11059473 Priority date : 05.03.1999 Priority country : JP

(54) CYCLIC GMP SPECIFIC PHOSPHODIESTERASE INHIBITOR AND SEXUAL DYSFUNCTION-IMPROVING DRUG

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a medicinal composition not causing a side effect, comprising a combination of several kinds of natural medications capable of chronically being used for a long term, and having reliable efficacy and useful cGMP-PDE inhibitory activity.

SOLUTION: This cGMP specific phosphodiesterase inhibitor is formulated with one or a combination of at least two selected from the group consisting of dry matter of leaves and stalks of plants belonging to the genus *Epimedium*, *Acanthopanax sintoccosus* (Rupr. et Maxim.) Harms, *Scutellariae Radix*, *Phellodendri Cortex*, *phocae thstis et penis*, seahorse, guarana, *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et Herder, seeds of *Juglans regia* L. var. *sinensis* DC., *cynomorii herba*, *Gardeniae Fructus*, *syakanzou*, *Torilis japonica* DC., *lingustri fructus* [L], *vagina ovarum mantidis*, *Panacis Japonici Rhizome*, *Anemarrhenae Rhizoma*, *Angelica pubescens forma bisserata* SHAN et YUAN, leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver, pseudocarps of *Rubus coreanus* Miq., *psoraleae semen*, *Amomi Amari Fructus*, *Ephedrae Herba*, *Asiasari Radix*, *nardostachyos rhizoma*, *perilla herb*, *Cinnamomi Cortex* (cassia bark), leaves of *Artemisia princeps* Pamp., *Magnoliae Cortex*, *Magnoliae officinalis* Rehd. et Wils., dry matter of entire plant of *Bupleurum chinense*, *Phyllostachys nigra* Munro var. *henonis* Stapf. ex Rendle, *Cyperi Rhizoma*, *Evodiae Fructus*, *Coptidis Rhizoma* and *Aurantii Immaturi Fructus*.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-319191

(P2000-319191A)

(43) 公開日 平成12年11月21日 (2000. 11. 21)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	W 4 C 0 8 8
A 6 1 P 15/10		31/00	6 1 5 G
43/00			6 4 3 D

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平11-135935	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社
(22) 出願日	平成11年5月17日 (1999. 5. 17)		大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(31) 優先権主張番号	特願平11-59473	(72) 発明者	奥野 憲治 大阪府池田市五月丘5丁目1番3号
(32) 優先日	平成11年3月5日 (1999. 3. 5)	(72) 発明者	梶井 直樹 奈良県奈良市三篠1丁目6番1号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	秋元 浩二 東京都世田谷区深沢8丁目6番4号
		(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葆 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイクリック GMP 特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤および性的機能障害改善薬

(57) 【要約】

【課題】副作用のない、穏やかで長期連用が可能な数種類の生薬の組み合わせからなる、確実な効果を有する有用な cGMP-PDE 阻害活性を有する医薬組成物の提供。

【解決手段】 インヨウカク、オウゴン、オウバク、ジャショウシ、ホコツシ、エゾウコギ、カイクジン、カイバ、ガラナ、カンゾウ、コトウニン、サヨウ、サンシシ、シャカンゾウ、ジョテイシ、ソウヒョウショウ、チクセツニンジン、チモ、ドッカウ、トチュウヨウ、フクボンシ、ヤクチニン、マオウ、サイシン、カンショウキョウ、ソヨウ、ケイヒ、ガイヨウ、コウボク、チクヨウ、チクジョ、コウブシ、ゴシュユ、オウレンおよびキツツの一つまたは二つ以上の組み合わせを配合してなるサイクリック GMP 特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インヨウカク、オウゴン、オウバク、ジャショウシ、ホコツシ、エゾウコギ、カイカクジン、カイバ、ガラナ、カンゾウ、コトウニン、サヨウ、サンシシ、シャカンゾウ、ジョテイシ、ソウヒョウショウ、チケツニンジン、チモ、ドクカツ、トチュウヨウ、フクボンシ、ヤクチニン、マオウ、サイシン、カンショウキョウ、ソヨウ、ケイヒ、ガイヨウ、コウボク、チクヨウ、チクジョ、コウブシ、ゴシュウ、オウレンおよびキヅツの一つまたは二つ以上の組み合わせを配合してなるサイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤。

【請求項2】 インヨウカク、オウゴン、オウバク、ジャショウシ、ホコツシ、エゾウコギ、カイカクジン、カイバ、ガラナ、カンゾウ、コトウニン、サヨウ、サンシシ、シャカンゾウ、ジョテイシ、ソウヒョウショウ、チケツニンジン、チモ、ドクカツ、トチュウヨウ、フクボンシおよびヤクチニンの一つまたは二つ以上の組み合わせを配合してなるサイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のサイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤を含有する医薬組成物。

【請求項4】 請求項1又は2に記載のサイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤を含有する性的機能障害改善用組成物。

【請求項5】 経口用である請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項6】 経口用である請求項4に記載の性的機能障害改善用組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、サイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ（cGMP-PDE）に起因する種々の機能障害や疾病症状を改善する生薬配合組成物に関する。特に、陰茎海綿体動脈中に特異的に存在するサイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ（cGMP-PDE）を阻害することで、海綿体動脈を弛緩させ、老化やストレス、糖尿病など種々の病状による機能的異常により引き起こされた性的機能障害の改善に有用な生薬配合医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 サイクリックグアノシン3',5'-リン酸(cGMP)は、生体内において細胞内情報伝達機構の2次伝達物質として重要な役割を果たしており、種々の細胞における機能発現の調節に関与している。cGMP-PDEの阻害剤は、細胞内のcGMP濃度を上昇させと考えられ、cGMP濃度の上昇は、平滑筋の弛緩、平滑筋細胞の増殖阻害、血球の内皮細胞への粘着阻害、血小板凝集阻害、感覚細胞におけるcGMP特異的イオンチャネルによるカリウムイオンおよびカルシウムイオンの流量の増加、上皮

細胞におけるナトリウムイオン流出促進とそれに伴う利尿作用と腎臓におけるナトリウムの排出促進、胃腸管における液体および電解質の流出などをもたらすことが知られている。また、cGMPは、心筋細胞においては、カリウムイオンおよびカルシウムイオンの流入の調節にも関与していると考えられている。したがって、cGMP-PDEの阻害剤は、狭心症、高血圧、心筋梗塞、動脈硬化などの循環器系疾患や、喘息や気管支炎などの閉塞性肺疾患、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、じんましんなどのアレルギー性疾患、過敏性腸症候群などの消化管の運動性に特徴づけられる疾患、線内障、勃起機能不全、雄性機能不全等の性的機能障害の予防および治療などに用いることが出来る。また、内皮由来弛緩因子(EDRF)、ニトロ系血管拡張薬、心房性ナトリウム利尿ペプチドの効果に対する増強作用も期待できる。これまでにcGMP-PDE阻害剤としては、ザプリナスト(Zaprinast)、E-4021、シルデナフィル(Sildenafil)などの結合ビリミジン誘導体およびその類縁化合物が報告されている。(E.S. ybertz and M.Czarnecki, Expert Opinion on Therapeutic Patents, 7, 631-639 (1997); M.Czarnecki, et al., Annual Reports in Medicinal Chemistry, 31, 61-70 (1996); 特開平10-120681号公報など)。

【0003】 また、従来より、伝統的漢方処方などのような数種類の生薬を配合した医薬組成物により、様々な理由による勃起不全障害や性欲減退、性的不感症などの性的機能障害の治療が試みられてきた。また、これらの処方方は、単に性的障害の治療にとどまらず、暴発労働、食欲不振、下痢などの消化機能障害、冷え症、排尿障害、不正性器出血など、老化や極度の疲労時、虚弱体質などに伴う様々な障害の治療も目的としてきた。これらの漢方処方を含む生薬製剤は、化学薬品に見られるような副作用がほとんどなく、穏やかで持続的な効果をもたらすが、作用機序が明確でなく、また、確実な効果をもたらすわけでは必ずしもない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、副作用のない、穏やかで長期運用が可能な数種類の生薬の組み合わせからなる、確実な効果を有する有用なcGMP-PDE阻害活性を有する医薬組成物を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、インヨウカク、オウゴン、オウバク、ジャショウシ、ホコツシ、エゾウコギ、カイカクジン、カイバ、ガラナ、カンゾウ、コトウニン、サヨウ、サンシシ、シャカンゾウ、ジョテイシ、ソウヒョウショウ、チケツニンジン、チモ、ドクカツ、トチュウヨウ、フクボンシ、ヤクチニン、マオウ、サイシン、カンショウキョウ、ソヨウ、ケイヒ、ガイヨウ、コウボク、チクヨウ、チクジョ、コウブシ、ゴシュウ、オウレンおよびキヅツに強いcGMP-PDE阻害活性を見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至

った。

【0006】すなわち、本発明は、

(1) インヨウカク、オウゴン、オウバク、ジャシヨウシ、ホコツシ、エゾウコギ、カイクジン、カイバ、ガラナ、カンゾウ、コトウニン、サヨウ、サンシシ、シャカンゾウ、ジョテイシ、ソウヒヨウシヨウ、チクセツニンジン、チモ、ドクカツ、トチュウヨウ、フクボンシ、ヤクチニン、マオウ、サイシン、カンシヨウキョウ、ソヨウ、ケイヒ、ガイヨウ、コウボク、チクヨウ、チクジョ、コウブシ、ゴシュユ、オウレンおよびキジツの一つまたは二つ以上の組み合わせを配合してなるサイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤；

(2) インヨウカク、オウゴン、オウバク、ジャシヨウシ、ホコツシ、エゾウコギ、カイクジン、カイバ、ガラナ、カンゾウ、コトウニン、サヨウ、サンシシ、シャカンゾウ、ジョテイシ、ソウヒヨウシヨウ、チクセツニンジン、チモ、ドクカツ、トチュウヨウ、フクボンシおよびヤクチニンの一つまたは二つ以上の組み合わせを配合してなるサイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤；

(3) 前記(1)又は(2)に記載のサイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤を含有する医薬組成物；

(4) 前記(1)又は(2)に記載のサイクリックGMP特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤を含有する性的機能障害改善用組成物；

(5) 経口用である前記(3)に記載の医薬組成物；

(6) 経口用である前記(4)に記載の性的機能障害改善用組成物；に関するものである。

【0007】本発明の生薬としては、インヨウカク、オウゴン、オウバク、ジャシヨウシ、ホコツシ、エゾウコギ、カイクジン、カイバ、ガラナ、カンゾウ、コトウニン、サヨウ、サンシシ、シャカンゾウ、ジョテイシ、ソウヒヨウシヨウ、チクセツニンジン、チモ、ドクカツ、トチュウヨウ、フクボンシおよびヤクチニンのグループ、若しくはこれらのグループに更にマオウ、サイシン、カンシヨウキョウ、ソヨウ、ケイヒ、ガイヨウ、コウボク、チクヨウ、チクジョ、コウブシ、ゴシュユ、オウレンおよびキジツを加えたグループの中から選ばれた一つまたは二つ以上組み合わせる生薬が挙げられる。ここで、上記コウボクには、ワコウボクおよびカラコウボクのいずれも含まれる。また、ケイヒには、いわゆるケイシが含まれる。

【0008】上記グループのうち、より好ましい成分としてはインヨウカク、ジャシヨウシ、ホコツシ、カイクジン、カイバ、サヨウ、ソウヒヨウシヨウ、フクボンシ、ケイヒ、ガイヨウ、コウブシ、ゴシュユおよびオウレンが挙げられる。これらもまた同様に、一つまたは二つ以上の組み合わせで用いることができる。

【0009】後述する試験例の結果から明らかなとおり

本発明の生薬はいずれもcGMP-PDE阻害活性を示すものであるが、これらは、古来単味又は複方剤として薬用されてきたものであり、それぞれ慣用された方法にしたがって得られる生薬又は抽出成分をそのまま用いることができる。生薬又は抽出成分の形態も、通常の市販品又はその加工品を使用することができる。生薬末としては、例えば、乾燥刻み加工品を更に細かく粉砕した粉末状(微粉末状)の乾燥品として使用してもよい。また、本発明の生薬からの抽出成分の形態は特に制限されるものではなく、例えば乾燥エキスを、エキスマ、軟エキスを、流エキスを、エタノール又はエタノールと水を含むチンキ等いずれの形態でも使用できる。好ましい本発明の生薬には、製剤化の自由度の高い抽出成分、例えば乾燥エキスマなどが含まれる。

【0010】抽出は、慣用の方法、例えば、抽出溶媒により前記生薬から活性成分を抽出することにより行うことができる。抽出溶媒としては、例えば水、親水性溶媒又はこれらの混合物を使用する場合が多い。前記親水性溶媒には、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、イソブタノール、s-ブタノール、t-ブタノール等のアルコール類；メチルセロソルブ、エチルセロソルブなどのセロソルブ類；アセトンなどのケトン類；ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類；ピリジン、モルホリン、アセトニトリル、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの含窒素溶媒などが挙げられる。これらの親水性溶媒は、単独又は2種以上の混合溶媒として使用してもよい。

【0011】特に、cGMP-PDEに対して高い阻害作用を有する成分を効率よく抽出するためには、例えば、①メタノール、エタノールなどの炭素数1〜3程度の水溶性アルコール(特にエタノール)または②これらのアルコール(特にエタノール)と水との混合溶液を抽出溶媒として用いるのが有用である。水と親水性溶媒との混合溶媒を前記抽出溶媒として使用する場合は、水と親水性溶媒との割合は、広い範囲、例えば、水/親水性溶媒=95/5〜5/95(重量比)程度の範囲から適当に選択できる。好ましい割合は、例えば、水/親水性溶媒=90/10〜50/50(重量比)、特に85/15〜60/40(重量比)程度である。このような溶媒は、本発明の生薬に対して1〜100重量部を抽出に使用する。好ましくは5〜500重量部、更に好ましくは、5〜200重量部である。

【0012】抽出操作は、適当な温度、例えば、10℃〜溶媒の還流温度、好ましくは15〜70℃程度で行うことが出来、室温で冷浸抽出することもできる。抽出時間は、加熱抽出の場合、30分以上、好ましくは30分間〜2時間、更に好ましくは1〜2時間である。また、冷浸抽出の場合は、3日間以上、好ましくは3〜30日間、更に好ましくは5〜14日間である。

【0013】抽出溶媒により抽出された抽出液は、その

まま使用してもよく、水などで希釈してもよく、抽出したエキスを濃縮した濃縮エキスとしても使用できる。通常、抽出液を濃縮した濃縮エキス、抽出物に必要により添加剤を添加して、スプレードライ、凍結乾燥などの方法により粉末化した乾燥エキスとして使用する場合が多い。

【0014】本発明の生薬の使用量は、cGMP-PDEに対する阻害活性が発現する有効量であればよく、剤形、投与経路、年齢、性的機能障害の程度や種類などにより異なるが、例えば、投与単位あたりおおよそ成人1日あたり、乾燥エキス換算で、0.1~5,000mg、好ましくは1~2,000mg、さらに好ましくは10~500mgになるように使用される。1日の投与回数は特に制限されず、1回又は数回に分けて投与できる。

【0015】本発明の生薬には、更に副成分としてトチュウ、ニンジン、ロクジョウ、ジオウ、サンヤク、サンシュウ、タクシャ、ブクリョウ、ボタンビ、プシ、オンジ、ゴミシ、クコシ、トシシ、ニクジョウ等の生薬を配合することもできる。これら副成分は、例えばトチュウ、ニンジンおよびロクジョウの組み合わせ、ジオウ、サダヤク、サンシュウ、タクシャ、ブクリョウ、ボタンビおよびプシの組み合わせのように組合せて、本発明の生薬に配合するのが好ましい。この場合の本発明の生薬に対する副成分の配合比率は、1:1~20（乾燥エキス換算重量比）、好ましくは1:1~10、更に好ましくは1:1~5である。

【0016】本発明の医薬組成物は、製剤の形態に応じて、例えば、混和、混練、造粒、打錠、コーティング、滅菌処理、乳化するなどの慣用の方法で製造することができる。これらの製剤の製造に関しては、日本薬局方製剤総則の各項に準じて製造することができる。本発明の医薬組成物は通常経口的に投与されるが、この場合の医薬組成物の形態は特に制限されるものでなく、例えば、錠剤、顆粒剤、細粒剤、丸剤、カプセル剤、チュアブル剤などの固形製剤、場合によっては、シロップ剤、懸濁剤、乳剤などの液剤であってもよい。

【0017】製剤の調製には、製剤の種類に応じて慣用の担体成分が使用できる。例えば、固形製剤の調製には、慣用成分、例えば、デンプン、乳糖、ショ糖、マンニトール、コンスターチンなどの糖類、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、軽質無水ケイ酸などの賦形剤；ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルエーテル、エチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、クエン酸カルシウム、デキストリン、ペクチンなどの結合剤；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、ポリエチレングリコール、コロイドシリカ等の滑沢剤；デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロ-

スナトリウムなどの崩壊剤、崩壊補助剤、保湿剤、界面活性剤などが使用できる。

【0018】液剤の調製には、慣用成分、例えば、注射用水、水、エチルアルコール、エチレングリコールなどの溶剤、エタノール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどの溶解補助剤、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、レシチン、モステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などの懸濁化剤；リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝剤、ブドウ糖、アミノ酸などを使用することができる。

【0019】前記固形製剤や液剤には、必要に応じて、保存剤、可溶化剤、乳化剤、分散剤、増粘剤、可塑剤、吸着剤、香料、着色剤、矯味矯臭剤、甘味剤、防腐剤、抗酸化剤などを使用することができる。

【0020】本発明の医薬および医薬組成物は、古来より薬用に用いられてきた生薬成分を主成分として用いるため、毒性や副作用がなく、きわめて安全性の高いものであり、ヒトを含む哺乳動物に安全に投与できる。本発明の医薬はcGMP-PDEに起因する種々の機能障害や疾患症状の改善に有効であり、特に、種々の原因による勃起機能不全など性機能障害の治療に有効である。

【0021】

【発明の実施の形態】以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0022】

【実施例】生薬乾燥エキス

以下の実施例で用いる生薬は、刻み50gに約7倍量（すなわち350ml）の30容量%エタノール水溶液を添加し、30 r.p.m.で攪拌しながら50℃で1.5時間抽出した。標準篩（呼び寸法75μm）を用いて濾過し、残渣を30容量%エタノール水溶液150mlで洗浄した。回収した濾液と洗浄液を合わせて、吸引濾過した。回収濾液を温度50℃以下で約50mlとなるまで減圧濃縮して、軟エキスを得た。この軟エキスを24時間凍結乾燥して、乾燥エキスを得て、これをを用いた。各々の用量はこのエキス素の重量を示す。

【0023】実施例1（製剤例・処方例）

以下、本発明の好ましい製剤例を記載するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記例において特に断らない限り、各成分の配合量は成人1日服用量を示し、常法に従い製剤化するものとする。

【0024】【製剤例1】

（処方） 成人1日服用量（3包中）

インヨウカク乾燥エキス末	500mg
ジャシヨウシ乾燥エキス末	100mg
カンゾウ乾燥エキス末	200mg
ケイヒ乾燥エキス末	200mg
ガイヨウ乾燥エキス末	300mg
クコシ乾燥エキス末	300mg
ニクジュヨウ乾燥エキス末	500mg
結晶セルロース	1,200mg
デンプン	500mg
ヒドロキシプロピルセルロース	180mg
乳糖	520mg
合計	4,500mg

上記処方に従い、混合末を製し、日本薬局方製剤総則、顆粒剤の項に準じて顆粒剤を製造した。

【0025】 [製剤例2]

(処方) 成人1日服用量 (3包中)

インヨウカク乾燥エキス末	500mg
ホコツシ乾燥エキス末	500mg
オウゴン乾燥エキス末	200mg
チクセツニンジン乾燥エキス末	200mg
シャカンゾウ乾燥エキス末	200mg
サヨウ乾燥エキス末	200mg
トシシ乾燥エキス末	150mg
オンジ乾燥エキス末	150mg
結晶セルロース	900mg
デンプン	600mg
ヒドロキシプロピルセルロース	180mg
乳糖	720mg

[製剤例4]

(処方)

トチュウ乾燥エキス末	60mg
ニンジン乾燥エキス末	100mg
ロクジョウ乾燥エキス末	100mg
インヨウカク乾燥エキス末	100mg
ホコツシ乾燥エキス末	200mg
ケイヒ乾燥エキス末	100mg
精製白糖	3,000mg
パラオキシ安息香酸ブチル	7.5 mg
フレーバー	0.06ml
水酸化ナトリウム	適量
精製水 (加えて全量)	60ml

上記処方に従い、日本薬局方製剤総則、液剤の項に準じて液剤を製造した。経過した後、減値してガラスビンに充填した。

【0029】 試験例

本発明の生薬のホスホジエステラーゼに対する阻害活性を、公知の方法(Thompson, W. J.ら、Biochemistry 10, 311(1971), J. D. Johnsonら、Anal. Chem. 162, 291(1987), R. J. Schillingら、Anal. Chem. 216, 154(1994)、Phosphodiesterase [i] cGMP SPA enzyme assay kit

*

* 合計	4,500mg
上記処方に従い、日本薬局方製剤総則、顆粒剤の項に準じて顆粒剤を製造した。	
【0026】 [製剤例3]	
〔素錠〕	
(処方) 成人1日服用量 (9錠中)	
インヨウカク乾燥エキス末	500mg
カイクジン乾燥エキス末	100mg
カイバ乾燥エキス末	100mg
ソウヒョウショウ乾燥エキス末	100mg
カンゾウ乾燥エキス末	200mg
結晶セルロース	444mg
デンプン	295mg
ヒドロキシプロピルセルロース	103mg
ステアリン酸マグネシウム	20mg
乳糖	700mg
小計	2,562mg
【0027】 [糖衣錠]	
素錠	2,544 mg
タルク	1,141.1mg
アラビアゴム	75.3mg
酸化チタン	46.3mg
白糖	1,104.3mg
合計	4,911mg
上記処方に従い、日本薬局方製剤総則、錠剤の項に準じて素錠および糖衣錠を製造した。	
【0028】	

*

成人1日服用量 (60ml中)

60mg
100mg
100mg
100mg
200mg
100mg
100mg
3,000mg
7.5 mg
0.06ml
適量
60ml

(アマシャム社)などに準じた以下の方法に従って測定した。

【0030】 (1) ヒト肺由来ホスホジエステラーゼVをコードする遺伝子のクローニング

cDNAのクローニングは、ジーントラップーポジティブ選択システム(ギボコビーアールエル社)を用いて行った。選択した大腸菌を培養後、DNAを抽出し、Thermo Sequenase Core Sequencing Kit (アマシャム社)を用いて反応を行い、SQ-3000 DNAシーケンサー (日立社)に

より、cDNA断片の塩基配列を決定した。取得したクローンは、配列番号：2で表される2499個の塩基配列を含有する3036個の塩基配列を有していた。このcDNA断片には、配列番号：1で表される833個のアミノ酸からなる新規ホスホジエステラーゼVがコードされていた。また、公知のウシ由来ホスホジエステラーゼV (Linda M. McAllisterら、J. Biol. Chem. 268 (30)、22869 (1993)、NCBI GenBank Accession No. L16545) とのアミノ酸レベルでの相同性は92%であった。本発明のヒト肺由来ホスホジエステラーゼVをコードするプラスミドpPDE50を大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10Bに導入して、形質転換体：大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10B/pPDE50を得た。

【0031】(2) 大腸菌発現ベクターの構築

上記(1)で得られたヒト肺由来ホスホジエステラーゼVをコードするcDNAをEcoRIとXhoIで切断し、同様に処理したpGEX4T-2 (ファルマシア社)とライゲーションした。ライゲーション液を用いて大腸菌BL21 (フナコシ社)を形質転換し、本発明のヒト肺由来ホスホジエステラーゼVを発現する大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21/pPDE51を取得した。この形質転換体：大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21/pPDE51は、平成10年7月13日から通商産業省工業技術院生命工学工業研究所 (NIBI) に寄託番号FERM BP-6417として、平成10年6月18日から財団法人・醸酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16185として寄託されている。

【0032】(3) 組換え型ヒト肺由来ホスホジエステラーゼVの大腸菌での発現と精製
上記(2)で得られた大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21/pPDE51を用いて、本発明の組換え型ヒト肺由来ホスホジエステラーゼVを取得した。大腸菌での発現および精製はGST Gene Fusion System (ファルマシア社) 添付のプロトコールに準じて行った。その結果、目的の約100kDaの組換え型ヒト肺由来ホスホジエステラーゼVが1Lの大

腸菌培養液から、12.5mg取得できた。

【0033】(4) ヒト肺由来ホスホジエステラーゼVのホスホジエステラーゼ活性の検出
ヒト肺由来ホスホジエステラーゼVのホスホジエステラーゼ活性の検出は、Phosphodiesterase [³H] cGMP SPA enzyme assay kit (アマシャム社)を用いて行った。その結果、上記(2)で得た酵素溶液にホスホジエステラーゼ活性が認められた。また、pGEX 4T-2をBL21に形質転換したものをコントロールとして用いたが、これにはホスホジエステラーゼ活性は認められなかった。

【0034】(5) 阻害剤探索系の設定

96穴プレート (OPTIプレート、パッカード社)に緩衝液 (0.5M Tris-HCl (pH7.5)、8.3mM MgCl₂、17mM EGTA) 10μL、上記(3)で得られた組換え型ヒト肺由来ホスホジエステラーゼV (0.025mg/mL) 10μL、超純水65μL、阻害剤サンプル5μL、³H] cGMP 10μLを添加し、30℃にて30分間反応した。反応終了後、SPA bead 溶液 (18mg/mL Yttrium silicate beads, 18mM ZnSO₄) 50μLを添加し、約20分間、室温で放置した後、シンチレーションカウンター (Topcount、パッカード社)を用いて測定した。無添加の場合の放射活性 (1780cpm) に対し、組換え型ヒト肺由来ホスホジエステラーゼVを添加した場合は、10367cpmの放射活性を示した。この反応に各種濃度のホスホジエステラーゼVの阻害剤であるシルデナフィル (Drugs of Future22(2)、1997)を添加することによりホスホジエステラーゼ活性は阻害され、シルデナフィルは約2nMでこの酵素反応を50%阻害した。このことから、本アッセイ系を用いて、ホスホジエステラーゼ阻害剤の探索が可能であることを確認した。

【0035】(6) 阻害剤探索の実施

上記(5)で設定した方法を用いて、本発明の生薬の組換え型ヒト肺由来ホスホジエステラーゼ阻害活性を測定した。その結果を表1に示す。

【表1】

生薬名	阻害率(%)		
	5mg/mL	0.5mg/mL	0.05mg/mL
インヨウカク	102.9	107.5	99.2
エソウコギ	109.6	100.4	64.1
オウゴン	113.1	111.2	98.7
オウバク	111.5	102.9	90.0
カイクジン	111.6	103.7	63.0
カイバ	109.8	96.0	61.8
ガラナ	114.9	109.1	66.9
カンゾウ	108.9	107.3	89.1
コトニン	113.1	107.1	90.4
サヨウ	109.7	105.0	57.6
サンシシ	110.9	94.6	52.6
シャカンソウ	104.9	106.6	88.7
ジャシヨウシ	114.9	110.0	98.3
ジャテイシ	114.9	105.9	75.0
ソウヒョウショウ	107.7	101.3	59.8
テクセンニンジン	111.7	108.4	66.2
デモ	108.7	96.2	55.7
トウドツカツ	110.6	99.3	64.6
トデュウヨウ	113.1	97.7	63.0
フクボンシ	112.7	109.6	92.6
ホコツシ	114.9	107.8	92.2
ヤクチニン	112.3	109.0	72.2
マオウ	95.4	89.5	25.0
サイシン	88.1	55.8	12.8
カンシヨウキョウ	99.5	83.8	24.1
ソヨウ	94.5	76.9	26.5
ケイヒ	104.9	106.4	51.9
ガイヨウ	103.7	95.4	58.1
ワコウボク	101.9	76.6	36.0
カラコウボク	100.8	67.8	29.2
テクミョ	94.7	58.4	18.3
テクジョ	91.6	93.0	28.7
コウブシ	104.2	90.2	49.2
ゴシユ	100.6	92.1	56.1
オウレン	106.2	97.6	75.9
キジツ	101.5	65.2	23.1

【0036】

【発明の効果】本発明の生薬は、優れたcGMP-PDE阻害活性を有しており、cGMP-PDEに起因する循環器系疾患（狭心症、高血圧、うっ血性心不全、肺高血圧症、アテローム性動脈硬化症、血管閉塞性低下症、血管狭窄症、末梢血管疾患、脳卒中など）、閉塞性肺疾患（慢性喘息、気管支炎など）、アレルギー性疾患（アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、蕁麻疹など）、消化管の運動*40

* 性に特徴づけられる疾患（過敏性腸症候群など）、性的機能障害（勃起機能不全、雌性機能不全など）、糸球体疾患、尿管管間質性疾患、腎不全、糖尿病合併症、緑内障、早産または月経困難症など種々の疾患機能不全の予防・治療剤として使用することが出来る。

【0037】

【配列表】

<110> Takeda Chemical Industries, LTD.

<120> cGMP-PDE inhibitor and medicine for treatment of sexual dysfunction

<130> A99041

<160> 2

<210> 1

<211> 833

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

13
 Met Leu Pro Phe Gly Asp Lys Thr Arg Glu Met Val Asn Ala Trp Phe
 1 5 10 15
 Ala Glu Arg Val His Thr Ile Pro Val Cys Lys Glu Gly Ile Arg Gly
 20 25 30
 His Thr Glu Ser Cys Ser Cys Pro Leu Gln Gln Ser Pro Arg Ala Asp
 35 40 45
 Asn Ser Val Pro Gly Thr Pro Thr Arg Lys Ile Ser Ala Ser Glu Phe
 50 55 60
 Asp Arg Pro Leu Arg Pro Ile Val Val Lys Asp Ser Glu Gly Thr Val
 65 70 75 80
 Ser Phe Leu Ser Asp Ser Glu Lys Lys Glu Gln Met Pro Leu Thr Pro
 85 90 95
 Pro Arg Phe Asp His Asp Glu Gly Asp Gln Cys Ser Arg Leu Leu Glu
 100 105 110
 Leu Val Lys Asp Ile Ser Ser His Leu Asp Val Thr Ala Leu Cys His
 115 120 125
 Lys Ile Phe Leu His Ile His Gly Leu Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Ser
 130 135 140
 Leu Phe Leu Val Cys Glu Asp Ser Ser Asn Asp Lys Phe Leu Ile Ser
 145 150 155 160
 Arg Leu Phe Asp Val Ala Glu Gly Ser Thr Leu Glu Glu Val Ser Asn
 165 170 175
 Asn Cys Ile Arg Leu Glu Trp Asn Lys Gly Ile Val Gly His Val Ala
 180 185 190
 Ala Leu Gly Glu Pro Leu Asn Ile Lys Asp Ala Tyr Glu Asp Pro Arg
 195 200 205
 Phe Asn Ala Glu Val Asp Gln Ile Thr Gly Tyr Lys Thr Gln Ser Ile
 210 215 220
 Leu Cys Met Pro Ile Lys Asn His Arg Glu Glu Val Val Gly Val Ala
 225 230 235 240
 Gln Ala Ile Asn Lys Lys Ser Gly Asn Gly Gly Thr Phe Thr Glu Lys
 245 250 255
 Asp Glu Lys Asp Phe Ala Ala Tyr Leu Ala Phe Cys Gly Ile Val Leu
 260 265 270
 His Asn Ala Gln Leu Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Glu Asn Lys Arg Asn
 275 280 285
 Gln Val Leu Leu Asp Leu Ala Ser Leu Ile Phe Glu Glu Gln Gln Ser
 290 295 300
 Leu Glu Val Ile Leu Lys Lys Ile Ala Ala Thr Ile Ile Ser Phe Met
 305 310 315 320
 Gln Val Gln Lys Cys Thr Ile Phe Ile Val Asp Glu Asp Cys Ser Asp
 325 330 335
 Ser Phe Ser Ser Val Phe His Met Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Ser
 340 345 350
 Ser Asp Thr Leu Thr Arg Glu His Asp Ala Asn Lys Ile Asn Tyr Met
 355 360 365
 Tyr Ala Gln Tyr Val Lys Asn Thr Met Glu Pro Leu Asn Ile Pro Asp
 370 375 380
 Val Ser Lys Asp Lys Arg Phe Pro Trp Thr Thr Glu Asn Thr Gly Asn
 385 390 395 400

Val	Asn	Gln	Gln	Cys	Ile	Arg	Ser	Leu	Leu	Cys	Thr	Pro	Ile	Lys	Asn
405															
Gly	Lys	Lys	Asn	Lys	Val	Ile	Gly	Val	Cys	Gln	Leu	Val	Asn	Lys	Met
420															
Glu	Glu	Asn	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Pro	Phe	Asn	Arg	Asn	Asp	Glu	Gln
435															
Phe	Leu	Glu	Ala	Phe	Val	Ile	Phe	Cys	Gly	Leu	Gly	Ile	Gln	Asn	Thr
450															
Gln	Met	Tyr	Glu	Ala	Val	Glu	Arg	Ala	Met	Ala	Lys	Gln	Met	Val	Thr
465															
Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Tyr	His	Ala	Ser	Ala	Ala	Glu	Glu	Thr	Thr	Arg
485															
Glu	Leu	Gln	Ser	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Pro	Ser	Ala	Gln	Thr	Leu
500															
Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Ser	Phe	Ser	Asp	Phe	Glu	Leu	Ser	Asp	Leu	Glu
515															
Thr	Ala	Leu	Cys	Thr	Ile	Arg	Met	Phe	Thr	Asp	Leu	Asn	Leu	Val	Gln
530															
Asn	Phe	Gln	Met	Lys	His	Gln	Val	Leu	Cys	Arg	Trp	Ile	Leu	Ser	Val
545															
Lys	Lys	Asn	Tyr	Arg	Lys	Asn	Val	Ala	Tyr	His	Asn	Trp	Arg	His	Ala
565															
Phe	Asn	Thr	Ala	Gln	Cys	Met	Phe	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Gly	Lys	Ile
580															
Gln	Asn	Lys	Leu	Thr	Asp	Leu	Glu	Ile	Leu	Ala	Leu	Ile	Ala	Ala	
595															
Leu	Ser	His	Asp	Leu	Asp	His	Arg	Gly	Val	Asn	Asn	Ser	Tyr	Ile	Gln
610															
Arg	Ser	Glu	His	Pro	Leu	Ala	Gln	Leu	Tyr	Cys	His	Ser	Ile	Met	Glu
625															
His	His	His	His	Phe	Asp	Gln	Cys	Leu	Met	Ile	Leu	Asn	Ser	Pro	Gly
645															
Gln	Ile	Leu	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Glu	Glu	Tyr	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys
660															
Ile	Ile	Lys	Gln	Ala	Ile	Leu	Ala	Thr	Asp	Leu	Ala	Leu	Tyr	Ile	Lys
675															
Arg	Arg	Gly	Glu	Phe	Phe	Glu	Leu	Ile	Arg	Lys	Asn	Gln	Phe	Asn	Leu
690															
Glu	Asp	Pro	His	Gln	Lys	Glu	Leu	Phe	Leu	Ala	Met	Leu	Met	Thr	Ala
705															
Cys	Asp	Leu	Ser	Ala	Ile	Thr	Lys	Pro	Trp	Pro	Ile	Gln	Gln	Arg	Ile
720															
Ala	Glu	Leu	Val	Ala	Thr	Glu	Phe	Phe	Asp	Gln	Gly	Asp	Arg	Glu	Arg
735															
Lys	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	Pro	Thr	Asp	Leu	Met	Asn	Arg	Glu	Lys	Lys
750															
Asn	Lys	Ile	Pro	Ser	Met	Gln	Val	Gly	Phe	Ile	Asp	Ala	Ile	Cys	Lys
765															
Gln	Leu	Tyr	Glu	Ala	Leu	Thr	His	Val	Ser	Glu	Asp	Cys	Phe	Pro	Leu
780															
795															
810															

17

18

Leu Asp Gly Cys Arg Lys Asn Arg Gln Lys Trp Gln Ala Leu Ala Glu
805 810 815

Gln Gln Glu Lys Met Leu Ile Asn Gly Glu Ser Gly Gln Ala Lys Arg
820 825 830

Asn

[0038]

<210> 2

<211> 2499

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ATGTTGCCCT TTGGAGCAA AACAGAGAA ATGGTCAATG CATGGTTTGC TGAGAGAGTT 60
CACACCATCC CTCGTGCAA GCAAGGTATC AGAGGCCACA CCAATCTTG CTCCTGTGCC 120
TTGCAGCAGA GTCCCTCGTC AGATAACAGT GTCCCTGGAA CACCAACCAG GAAATCTCT 180
GCCCTCGAAT TTGACCGGCC TCTTAGACCC ATTGTTGTCA AGGATCTGGA GGGAACTGTG 240
AGCTTCCTCT CTGACTCAGA AAGAAGGAA CAGATGCCCT TACCCTCC CAAAGTTTGT 300
CATGATGAAG GGGACCACTG CTCACAGCTC TTGGAATTAG TGAAGGATAT TCTAGTCAT 360
TTGGATGTCA CAGCTTATG TCACAAAAAT TTCTTGCATA TCCATGGACT GATATCTGCT 420
GACCGCTATT CCGTGTCTCT TGTCTGTGAA GACAGCTCCA ATGACAAGTT TCTTATCAGC 480
CGCCTCTTGG ATGTTGTCTG AGGTTCACAA CTGGAAGAAG TTTCAAATAA CTGTATCCGC 540
TTAGAATGGA ACAAGGCAT TGTGGGCAT GTGGCAGGCC TTGGTGAACC CTTGAACATC 600
AAAGATGCAT ATGAGGATCC TCGGTTCAAT GCAGAAGTTG ACCAAATTAC AGGCTACAAG 660
ACACAAAGCA TCTTTGTAT GCCAATTAAG AATCATAGGG AAGAGGTTGT TGGTGTAGCC 720
CAGGCCATCA ACAAGAAATC AGGAACGGT GGGACATTTA CTGAAAAGA TGAAGAAGAC 780
TTTGTCTGCTT ATTTGGCAAT TTGTTGTATT GTTCTTCATA ATGCTCAGCT CTATGAGACT 840
TCACTGCTGG AGAACAAAGG AAATCAGGTG CTGCTTGACC TTGCTAGTTT AATTTTGA 900
GAACAACAAT CATTAGAAGT AATTTTGAAG AAAATAGCTG CCACATTATT CTCTTCATG 960
CAAGTGCAGA AATGCACCAT TTTCATAGTG GATGAAGATT GCTCCGATTC TTTTCTAGT 1020
GTCTTTCACA TGGAGTGTGA GGAATTAGAA AAATCATCTG ATACATTAA CAGGGAACAT 1080
GATGCAACAA AATCAATTA CATGTATGCT CAGTATGTCA AAAATACTAT GGAACCACTT 1140
AATATCCAG ATGTCACTAA GGATAAAGA TTTCCTGGA CAACTGAAAA TACAAGAAAT 1200
CTAAACCAGC AGTGCATTAG AAGTTTCTT TGTACACCTA TAAAAATGG AAGAAGAAAT 1260
AAGTTATAG GGGTTTGCCA ACTTGTTAAT AAGATGGAGG AGAATGAGTG CAAGTTAAG 1320
CCTTTCACCC GAAATGACGA ACAGTTTCTG GAAGCTTTTG TCATCTTTTG TGGCTGGGG 1380
ATCCAGACAA CCGAGATGTA TGAAGCACTG GAGAGAGCCA TGCCCAAGCA AATGCTACA 1440
TTGAGAGTTC TGTCTATCA TGCTTCAGCA GCAGAGGAAG AAACAAGAGA CTTACAGTCG 1500
TTAGCGGCTG CTGTGGTGCC ATCTGCCCCAG ACCCTTAAAA TTACTGACTT TAGCTTCAGT 1560
GACTTTGAGC TGTCTGATCT GGAACAGCA CTGTGTACAA TTGGGATGTT TACTGACCTC 1620
AAGCTTGTGC AGAAGTTCCA GATGAACAT GAGGTTCTTT GCAGATGAT TTTAAGCTTT 1680
AACAAGAAAT ATCGGAAGAA TGTGCCCTAT CATAATTGGA GACATGCCCT TAATACAGCT 1740
CAGTGCATGT TTGCTGCTCT AAAAGCAGGC AAAATTCGA ACAAGCTGC TGACCTGGAG 1800
ATACTTGCA TGTCTGATTC TGCATAGC CAGCATTTGG ATCCAGCTGG TGTCAATAAC 1860
TCTTACATAC AGCGAAGTGA ACATCCACTT GCCCAGCTTT ACTGCCATTC AATCATGGAA 1920
CACCATCAT TTGACCACTG CCTGATGATT CTTAATAGTC CAGGCAATCA GATTCTCAAT 1980
GGCTCTCCA TTGAAGAATA TAAGACCAGC TTGAAAATA TCAAGCAAGC TATTTAGCT 2040
ACAGACCTAG CACTGTACAT TAAGAGCGGA GGAGAAATTT TTGAAGTTAT AGAAAAAAT 2100
CAATTCAATT TGGAAAGATCC TCATCAAAAG GACTTGTGTT TTGCAATGCT GATGACAGCT 2160
TGTGATCTTT CTGCAATTAC AAAACCTGG CCTATTCAAC AACCGATAGC AGAAGTTGTA 2220
GCAACTGAAT TTTTGTATCA AGGAGACAGA GAGAGAAAAA AACTCAACAT AGAACCCACT 2280
GATCTAATGA ACAGGGAGAA GAAAAACAAA ATCCCAAGTA TGCAAGTTGG GTTCAATAGT 2340

GGCATCTGCT TGCACCTGTA TGAGGCCCTG ACCCAGCTGT CAGAGGACTG TTTCCTTTG 2400
CTAGATGGCT GCAGAAAGAA CAGGCAGAAA TGGCAGGCC TTGCAGAAC GCAGGAGAAG 2460
ATGCTGATTA ATGGCGAAG CGGCCAGGCC AAGCGCAAC 2499

【図面の簡単な説明】

【図 1】 試験例で用いたヒト肺由来ホスホジエステラーゼ V のアミノ酸配列を示す。

【図 2】 試験例で用いたヒト肺由来ホスホジエステラーゼ V のアミノ酸配列を示す。図 1 のつづきである。 *

* 【図 3】 試験例で用いたヒト肺由来ホスホジエステラーゼ V をコードする DNA を含む DNA の配列を示す。

【図 4】 試験例で用いたヒト肺由来ホスホジエステラーゼ V をコードする DNA を含む DNA の配列を示す。図 3 のつづきである。

【図 1】

【図 2】

Met Leu Pro Phe Gly Asp Lys Thr Arg Glu Met Val Asn Ala Top Phe Ala Glu	18	Asn Thr Gly Asn Val Asn Glu Glu Cys Ile Arg Ser Leu Leu Cys Thr Pro Ile	414
Arg Val His Thr Ile Pro Val Tyr Cys Lys Glu Gly Ile Arg Gly His Thr Glu Ser	36	Lys Asn Gly Lys Lys Asn Lys Val Ile Gly Val Cys Glu Leu Val Asn Lys Met	422
Cys Ser Cys Pro Leu Glu Glu Ser Pro Arg Ala Asn Asp Ser Val Pro Gly Thr	54	Glu Glu Asn Thr Gly Lys Val Lys Pro Phe Asn Arg Asn Asp Glu Glu Phe Leu	450
Pro Thr Arg Lys Ile Ser Ala Ser Glu Phe Asp Arg Pro Leu Arg Pro Ile Val	72	Glu Ala Phe Val Ile Phe Cys Gly Leu Gly Ile Glu Asn Thr Glu Met Tyr Glu	458
Val Lys Asp Ser Glu Gly Thr Val Ser Phe Leu Ser Asp Ser Glu Lys Lys Glu	90	Ala Val Glu Arg Ala Met Ala Lys Glu Met Val Thr Leu Glu Val Leu Ser Tyr	466
Glu Met Pro Leu Thr Pro Pro Arg Phe Asp His Asp Glu Gly Asp Glu Cys Ser	108	His Ala Ser Ala Ala Glu Glu Thr Arg Glu Glu Glu Ser Leu Ala Ala Ala	604
Arg Leu Leu Glu Leu Val Lys Asp Ile Ser Ser His Leu Asn Val Thr Ala Leu	126	Val Val Pro Ser Ala Glu Thr Leu Lys Ile Thr Asp Phe Ser Phe Ser Asp Phe	522
Cys His Lys Ile Phe Leu His Ile His Gly Leu Ile Ser Ala Asp Arg Tyr Ser	144	Glu Leu Ser Asp Leu Glu Thr Ala Leu Cys Thr Ile Arg Met Phe Thr Asp Leu	540
Leu Phe Leu Val Cys Glu Asp Ser Ser Asn Asp Lys Phe Leu Ile Ser Arg Leu	162	Asn Leu Val Glu Asn Phe Glu Met Lys His Glu Val Leu Cys Arg Trp Ile Leu	558
Phe Asp Val Ala Glu Gly Ser Thr Leu Glu Glu Val Ser Asn Asn Cys Ile Asn	180	Ser Val Lys Lys Asn Tyr Arg Lys Asn Val Ala Tyr His Asn Trp Arg His Ala	576
Leu Glu Thr Asn Lys Gly Ile Val Gly His Val Ala Ala Leu Gly Glu Pro Leu	198	Phe Asn Thr Ala Glu Cys Met Phe Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys Ile Glu Asn	584
Asn Ile Lys Asp Ala Tyr Glu Asp Pro Arg Phe Asn Ala Glu Val Asp Glu Ile	216	Lys Leu Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ser His Asp	612
Thr Gly Tyr Lys Thr Glu Ser Ile Leu Cys Met Pro Ile Lys Asn His Arg Glu	234	Leu Asn His Arg Gly Val Asn Asn Ser Tyr Ile Glu Arg Ser Glu His Pro Leu	630
Glu Val Gly Val Ala Glu Ala Ile Asn Lys Lys Ser Gly Asn Gly Glu Thr	252	Ala Glu Leu Tyr Cys His Ser Ile Met Glu His His Phe Asp Glu Cys Leu	648
Phe Thr Glu Lys Asp Glu Lys Asp Phe Ala Tyr Leu Ala Phe Cys Gly Ile	270	Met Ile Leu Asn Ser Pro Gly Asn Glu Ile Leu Ser Gly Leu Ser Ile Glu Glu	656
Val Leu His Asn Ala Glu Leu Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Glu Asn Lys Arg Asn	288	Tyr Lys Thr Thr Leu Lys Ile Ile Lys Glu Ala Ile Leu Ala Thr Asp Leu Ala	684
Glu Val Leu Leu Asp Leu Ala Ser Leu Ile Phe Glu Glu Glu Glu Ser Leu Glu	306	Leu Tyr Ile Lys Arg Arg Gly Glu Phe Thr Glu Leu Ile Arg Lys Asn Glu Phe	702
Val Ile Leu Lys Lys Ile Ala Ala Thr Ile Ile Ser Phe Met Glu Val Glu Lys	324	Asn Leu Glu Asp Pro His Glu Lys Glu Leu Phe Leu Ala Met Leu Met Thr Leu	720
Cys Thr Ile Phe Ile Val Asp Glu Asp Cys Ser Asp Ser Phe Ser Ser Val Phe	342	Cys Asp Leu Ser Ala Ile Thr Lys Pro Trp Pro Ile Glu Glu Arg Ile Ala Glu	738
His Met Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Ser Ser Asp Thr Leu Thr Arg Glu His	360	Leu Val Ala Thr Glu Phe Phe Asp Glu Gly Asp Arg Glu Arg Lys Glu Leu Asn	756
Asp Ala Asn Lys Ile Asn Tyr Met Tyr Ala Glu Tyr Val Lys Asn Thr Met Glu	378	Ile Glu Pro Thr Asp Leu Met Asn Arg Glu Lys Lys Asn Lys Ile Pro Ser Met	774
Pro Leu Asn Ile Pro Asp Val Ser Lys Asp Lys Arg Phe Pro Thr Thr Glu Glu	396	Glu Val Gly Phe Ile Asp Ala Ile Cys Leu Glu Leu Tyr Glu Ala Leu Thr His	792
		Val Ser Glu Asn Cys Phe Pro Leu Leu Asn Gly Cys Arg Lys Asn Arg Glu Lys	810
		Trp Glu Ala Leu Ala Glu Glu Glu Lys Met Leu Ile Asn Gly Glu Ser Gly	828
		Glu Ala Lys Arg Asn	833

【図3】

ATG TTG CCG TTT GGA GAC AAA ACA AGA GAA ATG GTC AAT GGA TGG TTT GCT GAG
 AGA GCT CAC ACC ATC CTT GTG TGC AAG GAA GGT ATC AGA GGC CAC ACC GAA TCT
 TGC TGT TGT CCG TIG CAG CAG AGC GTT CCA GAT GAT GAG GGG GAG CAG TGG TGA
 TCA ACC AGG AAA ATC TCT GGC TCT GAA TTT GAC GGC GTT CTT AGA CCG ATT GTT
 CTC AAG GAT TGT GAG GAA ACT GTC AGC TTT CTC TGT GAT TGA GAA AAG AAG GAA
 CAG ATG CTT CTA ACC CTT CCA AGG TTT GAT CAT GAT GAA GGG GAG CAG TGG TGA
 AGA CTC TTG GAA TTA CTT GAG GAT ATT TCT AAT CAT TTG GAT GTC ACA GGC TTA
 TGT CAC AAA ATT TIG TTG CAT ATC CAT GGA CTA ATA TTT GCT GAC GGC TAT TCG
 CTC TTG CTT GTT TGT GAG GAG AGC TCC AAT GAG AAG TTT CTT AGC AGC GGC CTC
 TTT GAT CTT GCT GAA GGT TCA ACA CTG GAA GAA GTT TTA AAT AAG TTT ATC CCG
 TTA GAA TGG AAA AAG GGC ATT GTC GGA ACT GTG GGA GGC GTT GAT GGC TTT
 AAG ATC AAA GAT GGA TAT GAG GAT CTT CCG TTG AAT GGA GAA GTT GAC GAA ATT
 ACA GGC TAC AAA CAA GAA AGC ATT CTT TGT ATG CCA ATT AAG AAT CAT AGG GAA
 GAG GTT CTT GGT GTA GGC CAG GCT ATC AAG AAG AAA TCA GAA AAG GGT GGG ACA
 TTT ACT GAA AAA GAT GAA AAG GAT TTT GCT GAT TAT TTG GGA TTT TGT GGT ATT
 GGT CTT CAT AAT CCT CAG CTC TAT GAG AGC TGA CTC CTC GAG AAG AAG AAT
 CAG GTG CTG CTT GAG CTT GCT AGT TTA ATT TTT GAA GAA CAA GAA TCA TTA GAA
 GAA ATT TTG AAG AAA ATG GCT GGC ACT ATT ATC TCT TCT ATG GAA GTG CAG AAA
 TGC ACC ATT TTG ATA CTG GAT GAA GAT TGG TCG GAT TCT TTT TCT AGC GTG TTT
 CAC ATG GAG TGT GAG GAA TTA GAA AAA TCA TGT GAT ACA TTA ACA AGG GAA CAT
 GAT GGA AAG AAA ATT AAT CAT ATG TAT GCT CAG TAT CTC AAA AAT ACT AGG GAA
 CCA CTT AAT ATC CCA GAT CTC AGT AAG GAT AAA AGA TTT CCG TCG ACA ACT GAA
 AAT ACA GGA AAT GTA AAG CAG CAG TGT ATT AGA AGT TTT CTT TGT ACA CTT ATA
 AAA AAT GGA AAG AAG AAT AAA CTT ATA GGT GTT TCG GAA CTT GTT AAT AAG ATG

【図4】

54 GAG GAG AAT ACT GAG AAT GTT AAG CCG TTT AAG CCA AAT GAC GAA CAG TTT CTC 1359
 108 GAA GCT TTT GTC ATC TTT TGT GGC TTG GGC ATC CAG AAG AGC CAG ATG TAT GAA 1404
 162 GCA CTG GAG AGA GGC ATG GGC AAG CCA ATG CTC ACA TTG GAG GTT CTC TGT TAT 1458
 216 CAT GCT TGA GCA GGA GAG GAA GAA AGA GAG CTA CAG TGG TTA GCG GCT GCT 1512
 270 GTC GTC CCA TCT GGC CAG AAT CTT AAA ATT ACT GAT TTT AGC TTT AGT GAT TTT 1568
 324 GAG CTG TCT GAT CTG GAA ACA GCA CTG TGT ACA ATT TGG AAT TTT CAT GAT CTC 1620
 378 AAT CTT GTC CAG AAT TTT CAG ATG AAA CAT GAT GTT TTT TGG AGA TGG ATT TTA 1674
 432 AGT GGT AAG AAG AAT TAT CCG AAG AAT GGT GGT TAT CAT AAT TGG AGA CAT GCT 1728
 486 TTT AAT ACA GCT CAG TGC ATG TTT GCT GCT CTA AAA GCA GGC AAA ATT CAG AAT 1782
 540 AAG CAG ACT GAC CTC GAG ATA CTT GCA TTG CTT ATT CCA GAA AGG CAG GAT 1836
 594 TTT GAT CAG GGT GGT GAT AAT AAG TCT TAC TTA CAG GAA AGT GAA CAT CCA CTT 1890
 648 GAG CAG CTT TAC TGC CAT TCA ATC ATG GAA CAG CAT CAT TTT GAT CAG TCG CTC 1944
 702 ATG ATT CTT AAT AAT CCA GGC AAT CAG ATT CTC ACT GCT CTC TCC ATT GAA GAA 1998
 756 TAT AAG ACC AGC TTG AAA ATA AAT AAG GAA CTT ATT TTA GCT ACA GAT CTA GCA 2052
 810 CTC TAC ATT AAG AAG GGA GAA TTT TTT GAA CTT ATA GAA AAA AAT GAA TTT 2106
 864 AAT TTG GAA GAT CTT CAT GAA AAG GAG TTG TTT TTG GGA ATG CTG AAT GAA TTT 2160
 918 TGT GAT CTT TGT GGA ATT ACA AAA GGC TGG CTT ATT GAA GAA GGT ATA GAA 2214
 972 CTT GTA GCA ACT GAA TTT TTT GAT GAA CAG AAG GAA AAG AAA GAA CTC AAG 2268
 1026 ATA GAA CCG ACT GAT CTA AAG AAG AGG GAG AAG AAG AAA ATT CCA AAT ATG 2322
 1080 TAT GTT GGG TTG ATA GAT GCT ATG TCG TTG GAA CTT TAT GAG GCT CTC ACC CAG 2376
 1134 GTG TCA GAG GAG TGT TTT CTT CTA GAT GGC TGC GCA AAG AAG AGG CAG AAA 2430
 1188 TGG CAG GCT CTT GGA GAA CAG CAG CAG AAG ATG CTG ATT AAT GGC GAA AGC GCT 2484
 1242 CAG GGC AAG GGC AAT 2498

フロントページの続き

F ターム(参考) 4C088 AB04 AB12 AB16 AB17 AB18
 AB29 AB32 AB33 AB38 AB40
 AB41 AB51 AB59 AB60 AB62
 AB63 AB64 AB65 AB76 AB79
 AB81 AB85 AB99 AC04 AC05
 AC06 AC11 AC13 AD09 AD11
 AD13 BA03 BA06 BA07 BA08
 BA10 MA02 MA07 MA08 MA52
 NA14 ZA33 ZA34 ZA36 ZA40
 ZA42 ZA45 ZA54 ZA59 ZA66
 ZA81 ZA89 ZB13 ZC20